

# 63

## Circular Técnica

Corumbá, MS  
Maio, 2006

### Autores

**Fábio Galvani**  
Químico, Dr. em Ciências e  
Engenharia de Materiais  
Embrapa Pantanal  
CP 109, Corumbá, MS.  
CEP 79320-900.  
fgalvani@cpap.embrapa.br

**Elíney Gaertner**  
Biólogo  
Embrapa Pantanal  
CP 109, Corumbá, MS.  
CEP 79320-900.  
elíney@cpap.embrapa.br



## Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta

A quantidade de produtos químicos que é liberado no meio ambiente como emissões de rotina de laboratórios é enorme e apresenta um grande risco à saúde da sociedade. No entanto, as vantagens que esses produtos podem trazer para a indústria química moderna e as pesquisas científicas de um modo geral são indiscutíveis. Nesse contexto, uma política que venha a ter como objetivo evitar a geração de resíduos na fonte, com a aplicação de tecnologias que utilizem menores quantidades de matéria-prima e recursos naturais em geral, é imprescindível (Alberguini, 2005). Ações de programas de gerenciamento de resíduos devem estar norteadas para a minimização ou mesmo eliminação de alguns resíduos produzidos nos laboratórios. Uma das estratégias recomendadas para se adequar a esta nova realidade é substituir ou diminuir a quantidade de reagentes, ou ainda, modificar procedimentos (Simeone, 2005).

Com o objetivo de diminuir a quantidade de resíduos gerados e, conseqüentemente, custos este trabalho propõe uma adequação do método de Kjeldahl a partir da redução na quantidade de cada reagente utilizado durante o processo para a determinação do nitrogênio total. Foram realizados ensaios com amostras de três espécies de forrageiras da região do Pantanal (*Andropogon bicornis*, *Reimarochloa* sp. e *Luziola subintegra*) e uma amostra padrão de referência do Programa Colaborativo Interlaboratorial coordenado pela Embrapa Meio Ambiente. Análises estatísticas foram realizadas para averiguar a precisão da nova metodologia proposta.

### Princípio

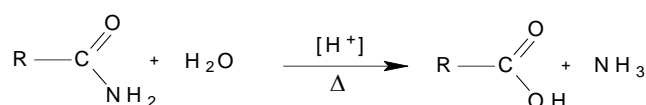
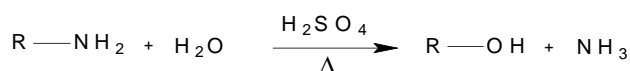
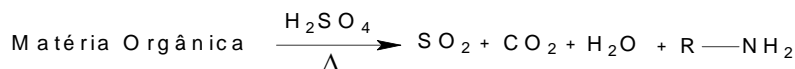
A determinação do nitrogênio total (NT) proposta por Kjeldahl em 1883, ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e ao longo do tempo permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações (Vogel, 1992). Esta técnica possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas, assim como o nitrogênio em plantas para a avaliação do estado nutricional (Yasuhara e Nokihara, 2001; Nogueira e Souza, 2005).

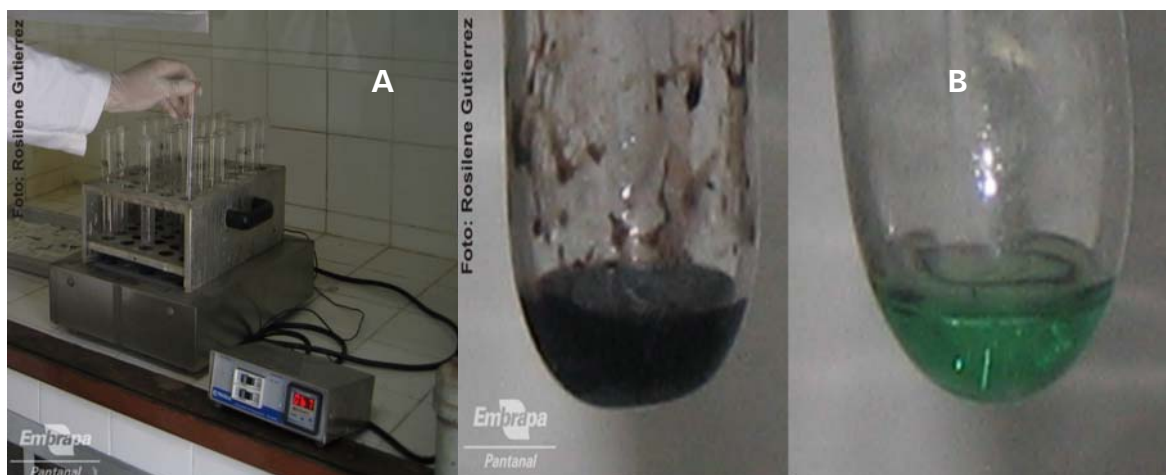
O método é baseado na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 400°C com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido diluído (Nogueira e Souza, 2005).

As reações químicas que se passam durante o processo da determinação dos compostos nitrogenados podem ser assim resumidas (Silva, 1990):

### Digestão

Durante a digestão (Figura 1A) ocorrem as seguintes reações:





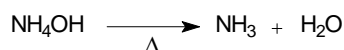
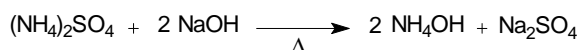
**Figura 1.** (A) Digestão de uma amostra para a determinação de nitrogênio total. (B) Mudança de coloração da solução durante o processo da digestão.

O carbono contido na matéria orgânica é oxidado e o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) se desprende. Durante o processo da digestão a solução passa de uma coloração escura (preto) para um verde claro (Figura 1B).

Além dos agrupamentos protéicos, existe o nitrogênio sob a forma de amina, amida e nitrila, que é transformado em amônia ( $\text{NH}_3$ ) a qual reage com o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , formando o sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) conforme mostrado nas reações durante a digestão, e esse ao esfriar forma cristais.

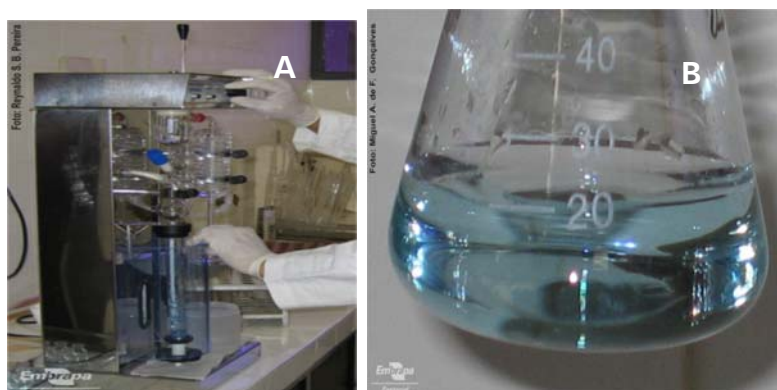
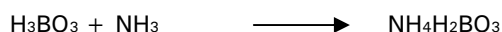
## Destilação

Após a digestão inicia-se o processo de destilação (Figura 2A) que pode ser feita por aquecimento direto ou por arraste de vapor. O sulfato de amônio é tratado com hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), em excesso, ocorrendo a liberação de amônia, conforme as reações:



Ao se adicionar o hidróxido de sódio, deve-se utilizar algumas gotas de solução indicadora, no destilador, para garantir um ligeiro excesso de base. A amônia que desprende na reação é coletada num frasco contendo ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) com o indicador, previamente adaptado ao conjunto da destilação.

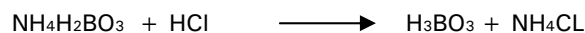
Considera-se terminado o processo, quando toda a amônia já se desprende. A solução contendo ácido bórico com o indicador que no início apresentava coloração rósea adquire a cor azulada (Figura 2B) à medida que vai se formando o borato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ), conforme a reação:



**Figura 2.**(A) Processo de destilação.(B) Formação do borato de amônio.

## Titulação

A última etapa do processo corresponde a titulação (Figura 3A). O borato de amônio é titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl) de título conhecido até a viragem do indicador (Figura 3B), conforme a reação:



**Figura 3.** (A) Titulação para a determinação da dosagem de nitrogênio. (B) Viragem na titulação para a determinação da dosagem de nitrogênio total.

O nitrogênio total (NT) é determinado pela seguinte equação:

$$\text{NT} = \frac{(\text{Va} - \text{Vb}) \times \text{F} \times 0,1 \times 0,014 \times 100}{\text{P1}}$$

Onde:

NT – teor de nitrogênio total na amostra, em percentagem;

Va – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mililitros;

Vb – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, em mililitros;

F – fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol/L;

P1 – massa da amostra (em gramas).

Na determinação da proteína bruta, multiplica-se o valor do nitrogênio total encontrado pelo método de Kjeldahl por um fator que converte o nitrogênio em proteína. Convencionalmente, em amostras de alimentos para animais: plantas forrageiras, rações concentradas, entre outros materiais, a proteína bruta (PB) é expressa pelo fator 6,25, considerando que a maioria das proteínas contém nas suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio. A expressão abaixo é utilizada para determinar a proteína bruta:

$$\text{PB} = \text{NT} \times \text{F}_\text{N}$$

Onde:

PB – teor de proteína bruta na amostra, em percentagem;

F<sub>N</sub> – 6,25.

Expressa-se o resultado corrigido, tendo-se como base de correção a matéria seca a 105°C.

Deve-se fazer testes em branco com o objetivo de eliminar a interferência e contaminação dos reagentes.

## Parte Experimental

### Materiais e Equipamentos

- Bloco digestor;
- Capela para exaustão de gases;
- Destilador de nitrogênio;
- Bureta automática;
- Agitador magnético;
- Erlenmeyer de 50 mL;
- Balança analítica - precisão ( $\pm 0,0001$ g);
- Tubo de ensaio com borda reforçada (25x250 mm);
- Frascos dosadores de reagente;
- Espátula;
- Papel impermeável.

### Reagentes e Soluções

- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  –  $d = 1,84$ ), p.a., concentrado;
- Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a 40% (m/v);
- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ );
- Sulfato de cobre pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ );
- Ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,01 mol/L;
- Solução alcoólica de verde de bromocresol, a 0,1% (m/v);
- Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1% (m/v);
- Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,04% (m/v);
- Solução de ácido bórico, a 2% (m/v).

### Mistura Catalisadora

Pesar 1000 g de sulfato de sódio anidro, pesar 50 g de sulfato de cobre pentaidratado. Em um recipiente misturar os reagentes e em seguida acondicionar em frasco com tampa. Segundo a metodologia descrita no Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Animal e Alimentos (Nogueira e Souza, 2005), 2,5 g de selênio em pó são adicionados na mistura catalisadora. Neste trabalho optou-se por não usar o selênio como catalisador com o intuito de minimizar a geração de resíduos durante o processo.

### Solução receptora indicadora

Misturar 1000 mL de solução de ácido bórico a 2%, 6 mL de solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1% e 15 mL de solução alcoólica de verde de bromocresol.

### Procedimento

Foram realizadas cinco baterias de testes com 30 amostras por bateria. As amostras analisadas foram de três espécies de forrageiras (*Andropogon bicornis*, *Reimaroachloa* sp. e *Luziola subintegra*), que geralmente apresentam níveis diferenciados da concentração de nitrogênio total e proteína bruta, além de uma amostra padrão de referência (Volumoso AR4) do Programa Colaborativo Interlaboratorial (PCI) ano 7 de 2004 coordenado pela Embrapa Meio Ambiente.

A determinação do nitrogênio total e proteína bruta foram realizadas pelo processo de digestão Kjeldahl conforme metodologia atual adotada pela Embrapa e descrita no Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Animal e Alimentos (Nogueira e Souza, 2005), porém a quantidade de amostra e de cada reagente utilizado para o estudo da adequação da metodologia foram reduzidos conforme apresentado na Tabela 1. Determinou-se a matéria seca de cada amostra a 105°C para fazer a correção e expressar os resultados de proteína bruta.

**Tabela 1.** Quantidade de amostra e reagentes utilizados nos processos para a determinação do nitrogênio total segundo: MA – metodologia atual (Nogueira e Souza, 2005) e MP - método proposto neste estudo.

Componente	MA	MP
Amostra	0,1-0,2 g	0,03-0,04 g
Mistura catalisadora	2 g	0,4-0,45 g
Ácido sulfúrico concentrado	5 mL	0,65 mL
Água destilada (após a digestão)	20 mL	2 mL
Solução receptadora indicadora	10 mL	1,25 mL
Hidróxido de sódio a 40%	15 mL	6,20 mL
Ácido clorídrico	0,1mol/L	0,01 mol/L

Após a obtenção dos resultados pelas duas metodologias, foi realizada uma análise estatística para averiguar a precisão da metodologia proposta, comparando-se os dados de proteína bruta da amostra de referência (Volumoso AR4) fornecidos pelo PCI com os obtidos pela metodologia proposta. Realizou-se também um levantamento da descrição estatística dos resultados de nitrogênio total e proteína bruta das demais amostras.

## Resultados e Discussões

Na Tabela 2 encontram-se os resultados de matéria seca das amostras estudadas que servirão como base para o cálculo corrigido dos valores de proteína bruta.

**Tabela 2.** Matéria seca a 105°C das amostras estudadas.

Amostra	Matéria Seca (%)
Volumoso AR4	93,32
<i>Andropogon bicornis</i>	92,22
<i>Reimarochloa</i> sp.	92,57
<i>Luziola subintegra</i>	91,57

Na Tabela 3 encontram-se os resultados de nitrogênio total e proteína bruta das amostras analisadas. Os valores de proteína bruta estão corrigidos com base nos resultados de matéria seca a 105°C de cada material.

**Tabela 3.** Resultados de nitrogênio total e proteína bruta das amostras estudadas.

Número da amostra	Volumoso AR4 (MA)		Volumoso AR4 (MP)		<i>Andropogon bicornis</i>		<i>Reimarochloa</i> sp.		<i>Luziola subintegra</i>	
	NT	PB	NT	PB	NT	PB	NT	PB	NT	PB
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	1,32	8,84	1,42	9,54	0,35	2,35	1,11	7,47	1,76	12,03
2	1,32	8,84	1,42	9,54	0,34	2,33	1,10	7,43	1,78	12,12
3	1,38	9,29	1,42	9,52	0,32	2,15	1,11	7,47	1,81	12,35
4	1,33	8,90	1,45	9,70	0,37	2,51	1,12	7,53	1,78	12,13
5	1,37	9,17	1,43	9,60	0,37	2,49	1,12	7,54	1,72	11,72
6	1,39	9,32	1,39	9,29	0,36	2,44	1,13	7,62	1,74	11,91
7	1,37	9,19	1,42	9,50	0,37	2,48	1,11	7,47	1,74	11,91
8	1,33	8,87	1,41	9,46	0,33	2,26	1,07	7,24	1,77	12,09
9	1,34	8,95	1,41	9,42	0,37	2,51	1,11	7,48	1,78	12,15
10	1,37	9,16	1,44	9,67	0,37	2,53	1,10	7,42	1,73	11,81
11	1,33	8,88	1,41	9,45	0,36	2,46	1,11	7,50	1,81	12,37
12	1,33	8,91	1,39	9,32	0,36	2,46	1,11	7,49	1,86	12,72
13	1,34	8,96	1,44	9,66	0,36	2,45	1,10	7,46	1,86	12,69
14	1,35	9,06	1,42	9,49	0,36	2,47	1,10	7,46	1,90	12,99
15	1,32	8,87	1,39	9,33	0,35	2,36	1,13	7,63	1,90	12,96
16	1,38	9,25	1,44	9,66	0,36	2,45	1,11	7,47	1,88	12,80
17	1,34	8,96	1,45	9,74	0,36	2,45	1,10	7,46	1,86	12,72
18	1,33	8,93	1,39	9,31	0,37	2,48	1,13	7,66	1,93	13,17
19	1,32	8,83	1,38	9,63	0,35	2,39	1,15	7,77	1,87	12,75
20	*	*	1,44	9,68	0,35	2,35	1,14	7,70	1,84	12,57
21	1,45	9,72	1,37	9,18	0,35	2,39	1,06	7,18	1,74	11,89
22	1,36	9,12	1,41	9,45	0,37	2,50	1,09	7,28	1,81	12,38
23	1,35	9,01	1,36	9,14	0,35	2,38	1,05	7,11	1,82	12,44
24	1,36	9,14	1,45	9,71	0,36	2,46	1,13	7,66	1,85	12,64
25	1,37	9,17	1,41	9,41	0,36	2,44	1,05	7,07	1,84	12,58
26	1,28	8,58	1,42	9,49	0,34	2,33	1,08	7,30	1,82	12,39
27	1,30	8,71	1,40	9,38	0,41	2,75	1,06	7,17	1,88	12,85
28	1,34	8,95	1,46	9,75	0,33	2,27	1,08	7,29	1,80	12,27
29	1,33	8,90	1,43	9,56	0,36	2,45	1,07	7,24	1,83	12,50
30	1,31	8,76	1,44	9,63	0,34	2,33	1,06	7,18	1,83	12,44

\* Não determinado, pois se perdeu a amostra durante a análise.

A precisão de uma metodologia representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão (s) e/ou coeficiente de variação (CV) das medidas obtidas, que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20 (Ribani, 2004), onde o coeficiente de variação não deve ultrapassar 15% (Valentini, 2002).

Comparando-se os dados estatísticos de proteína bruta da amostra de referência (Volumoso AR4) com os obtidos pela metodologia atual empregada pela Embrapa e a metodologia proposta (Tabela 4) pode-se avaliar a precisão da nova metodologia. Tanto o desvio padrão quanto o coeficiente de variação, determinados pela metodologia em estudo são menores que os fornecidos pela metodologia atual da Embrapa e pelo PCI. Portanto as alterações nas quantidades dos reagentes proposta pela metodologia em estudo não influenciaram significativamente nos resultados de proteína bruta e apresentaram precisão compatível com a metodologia atualmente utilizada.

**Tabela 4.** Análise estatística de proteína bruta (PB) para amostras de referência do volumoso AR4 do Programa Colaborativo Interlaboratorial (PCI) ano 7 de 2004, amostras submetidas a metodologia atual (MA) empregada na Embrapa e amostras submetidas a metodologia proposta (MP).

Parâmetro	PCI ano 7 de 2004	MA	MP
Média (M)	9,54	9,01	9,51
Desvio padrão (s)	0,65	0,23	0,17
Coeficiente de variação (CV %)	6,86	2,51	1,72
Número de determinações (N)	183	29	30

Foram realizados testes com diferentes espécies forrageiras (*Andropogon bicornis*, *Reimarochloa* sp. e *Luziola subintegra*) utilizando a metodologia proposta. Estas espécies geralmente apresentam níveis diferenciados da concentração de nitrogênio total e proteína bruta. As avaliações estatísticas para os resultados de nitrogênio total e proteína bruta encontram-se nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

**Tabela 5.** Análise estatística para o nitrogênio total das espécies: *Andropogon bicornis*, *Reimarochloa* sp. e *Luziola subintegra* determinadas com a metodologia proposta.

Nitrogênio Total	<i>Andropogon bicornis</i>	<i>Reimarochloa</i> sp.	<i>Luziola subintegra</i>
Média (M)	0,360	1,100	1,820
Erro padrão	0,003	0,005	0,010
Desvio padrão (s)	0,017	0,027	0,056
Variância da amostra	0,0003	0,0007	0,0031
Intervalo	0,090	0,100	0,210
Mínimo	0,320	1,050	1,720
Máximo	0,410	1,150	1,930
Coeficiente de variação (CV %)	4,680	2,490	3,070
Número de determinações (N)	30	30	30



**Tabela 6.** Análise estatística para a proteína bruta das espécies: *Andropogon bicornis*, *Reimarochloa* sp. e *Luziola subintegra* determinadas com a metodologia proposta.

Proteína Bruta	<i>Andropogon bicornis</i>	<i>Reimarochloa</i> sp.	<i>Luziola subintegra</i>
Média (M)	2,42	7,43	12,41
Erro padrão	0,02	0,03	0,07
Desvio padrão (s)	0,11	0,18	0,38
Variância da amostra	0,01	0,03	0,14
Intervalo	0,60	0,70	1,45
Mínimo	2,15	7,07	11,72
Máximo	2,75	7,77	13,17
Coeficiente de variação (CV %)	4,40	2,46	3,06
Número de determinações (N)	30	30	30

Os parâmetros estatísticos de nitrogênio total e proteína bruta das espécies forrageiras indicaram um baixo grau de dispersão dos resultados e auxiliaram na confirmação da precisão da metodologia proposta.

## Conclusões

A nova metodologia proposta possibilitou atingir os objetivos específicos do trabalho: diminuir a quantidade de resíduos gerados, o consumo de reagentes e os custos para a determinação de nitrogênio total e proteína bruta pelo método Kjeldhal. Além disso, foi verificado que as alterações nas quantidades dos reagentes proposta neste método não influenciaram significativamente nos resultados e na precisão do mesmo.

Diante destes resultados, esta metodologia passou a ser adotada como análise padrão pela Embrapa Pantanal para a determinação de nitrogênio total e proteína bruta de tecidos, produtos e subprodutos de origem animal e vegetal.

## Agradecimentos

Às pesquisadoras Dra. Sandra Aparecida Santos e Dra. Sandra Mara Araújo Crispim por permitirem utilizar as espécies forrageiras de seus respectivos projetos de pesquisa neste estudo. À equipe de apoio técnico: Reynaldo Sidney Brandão Pereira e Rosilene Gutierrez pelo auxílio no registro das fotografias e Miguel Ageu de Faria Gonçalves pelo auxílio no registro das fotos e na realização das análises.

## Referências Bibliográficas

- ALBERGUINI, L. B. A. Gerenciamento e tratamento de resíduos químicos. In: Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratórios da Embrapa, 10. São Carlos, 2005. **Resumos...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.
- NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.
- RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SILVA, D. J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1990. 165p.



SIMEONE, M. L. Implementação de um programa de gerenciamento de resíduos em laboratórios. In: MET – Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratórios da Embrapa, 10. São Carlos, 2005. **Resumos...**São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 4581-4583, 2001.

VALENTINI, S. A. **Atributos da validação da metodologia analítica do Captopril num programa de garantia de qualidade**. 75p. 2002. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. Disponível em:

<<http://teses.eps.ufsc.br/defesa/pdf/8241.pdf>> .Acesso em: 22 fev. 2006.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Tradução: Horácio Macedo. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1992. 712p.

### **Circular Técnica, 63**

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Pantanal  
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880  
Caixa Postal 109  
CEP 79320-900 Corumbá, MS  
Fone: 67-32332430  
Fax: 67-32331011  
Email: [sac@cpap.embrapa.br](mailto:sac@cpap.embrapa.br)

1ª edição  
1ª impressão (2006): formato digital

### **Comitê de Publicações**

**Presidente:** *Thierry Ribeiro Tomich*  
**Secretário-Executivo:** *Suzana Maria Salis*  
**Membros:** *Debora Fernandes Calheiros*  
*Marcel Henrique Amici Jorge*  
*Jorge Antônio Ferreira de Lara*  
*Regina Célia Rachel dos Santos*

### **Expediente**

**Supervisor editorial:** *Suzana Maria Salis*  
**Revisão de texto:** *Mirane dos Santos Costa*  
**Tratamento das ilustrações:** *Regina Célia R. Santos*  
**Editoração eletrônica:** *Regina Célia R. Santos*